HPLC-ELSD法联合UPLC-MS/MS法检测鱼腥草注射液中非法添加的庆大霉素

王静文1，2， 龚旭昊2， 范 强2[[1]](#footnote-1)， 孙 雷2， 汪 霞2

（1.中国食品药品检定研究院，北京 102629；2.中国兽医药品监察所，北京 100081）

**[摘要]** 为检测鱼腥草注射液中非法添加的庆大霉素，建立了以HPLC-ELSD进行初筛，UPLC-MS/MS进行确证并定量的系统方法。以十八烷基键合硅胶为填充剂，0.2 mol/L三氟醋酸 -甲醇（92:8）为流动相作为HPLC-ELSD初筛条件。以0.1%甲酸乙腈溶液-0.1%甲酸水溶液（10∶90）为流动相，流速为0.3 ml/min，在电喷雾离子化电离源上以多反应监测方式进行正离子检测，建立UPLC-MS/MS检测方法，用于定量分析的离子对为m/z 478.6→157.1（庆大霉素C1）。结果表明，庆大霉素C1在0.15 µg/ml～1.35 µg/ml 浓度范围内，峰面积与浓度呈良好的线性关系,线性方程为y=5519.3x+879.24，R=0.9965。庆大霉素C1在鱼腥草注射液中检测限为0.15 g/L。

**[关键词]** 庆大霉素；鱼腥草注射液；液相色谱-蒸发光散射检测器；超高效液相色谱-串联质谱

Determination of Gentamicin Illegally Added in Houttuynia Injection by HPLC-ELSD and UPLC-MS/MS

Wang Jing-wen1，2, Gong Xu-hao2, Fan Qiang2, Sun Lei2, Wang Xia2

*(1.National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629; 2.China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081)*

Corresponding author: Fan Qiang, E-mail: fanqiang@ivdc.org.cn

**Abstract:** A primary screening method of Gentamicin in Houttuynia Injection was established by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detector (HPLC-ELSD), using 0.2 mol/L trifluoroacetic acid and methanol (92:8) as the mobile phase. A qualitative and quantitative method of Gentamicin in Houttuynia Injection was established by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), using water (0.1% formic acetic) and acetonitrile (0.1% formic acetic) (90:10) as the mobile phase at a flow rate of 0.3 ml/min. At positive electrospray ionization mode, selected reaction monitoring of the precursor-product ion transitions m/z of 478.6→157.1 (C1) for gentamicin. The linear calibration curve of gentamicin was y=5519.3x+879.24 (R=0.9965)，obtained in a concentration range of 0.15 µg/ml～1.35 µg/ml with a limit of detection of 0.15 g/L in Houttuynia Injection .

**Key Words:** Gentamicin; Houttuynia Injection; HPLC-ELSD; UPLC-MS/MS

鱼腥草注射液为鱼腥草经水蒸气蒸馏制成的灭菌水溶液，具有清热解毒，消肿排脓，利尿通淋的功能 [1]，在中兽医临床具有广泛应用。然而，近两年来，本课题组已先后在鱼腥草注射液中发现有非法添加甲氧氯普胺、林可霉素、水杨酸、氧氟沙星[2-4]等化学药品的现象，最近又在一批委托检验样品中检出庆大霉素。这种在处方外非法添加化学药品的现象不仅严重威胁了动物用药安全，扰乱了兽药市场，也给动物源性食品安全带来了隐患。

庆大霉素是一种氨基糖苷类广谱抗生素，主要用于治疗细菌感染，尤其是革兰阴性菌引起的感染[5]。分析庆大霉素常见的方法有微生物法、荧光免疫法、薄层色谱法、高效液相色谱法等，其中仅有色谱技术能定量庆大霉素中各组分的含量。目前尚未有应用UPLC-MS/MS检测兽药中非法添加庆大霉素的报道，本实验首次建立了HPLC-ELSD联合UPLC-MS/MS系统筛查鱼腥草注射液中庆大霉素的方法，以期为相关工作提供技术支持。

**1.仪器与材料**

1.1 仪器 SHIMADZU高效液相色谱仪SPD-20A（日本岛津公司）、Alltech ELSD 2000ES、Waters Acquity 超高效液相色谱（美国Waters 公司）、Waters Quattro Premier XE（美国Waters 公司）、Masslynx工作站软件（美国Waters 公司）、 Mettler XS205型十万分之一天平（美国Mettler Toledo公司）、MiliQ纯水机。

1.2 试药与试剂 庆大霉素对照品（C1a：27.8%，C2：24.6%，C2a：22.0%，C1：25.7%，批号：K0071502，中国兽医药品监察所）。供试品：鱼腥草注射液空白样品（批号：150303），鱼腥草注射液阳性样品（批号：2015122611）。乙腈（Merck，色谱纯，批号：1747130433），甲醇（Merck，色谱纯，批号：1748007433），甲酸（Fisher Scientific，色谱纯，批号：106055A），七氟丁酸酐（HFBA，Alfa Aesar，色谱纯，10132012），三氟醋酸（Fisher Scientific，色谱纯，135262），去离子水（MiliQ纯化系统制备的去离子水）。

**2.方法**

2.1 溶液制备

2.1.1 HPLC-ELSD用鱼腥草注射液样品溶液制备 取鱼腥草注射液样品1.0 ml，置锥形瓶中，加0.2 mol/L三氟醋酸-甲醇（92:8）稀释至50 ml，摇匀；过0.45 μm滤膜，即得。

2.1.2 UPLC-MS/MS用鱼腥草注射液样品溶液制备 取鱼腥草注射液样品1.0 ml，置刻度管中，加5 mmol/L七氟丁酸酐溶液稀释至10 ml，摇匀；取200 μl，置刻度管中，加5 mmol/L七氟丁酸酐溶液稀释至10 ml，摇匀；过0.22 μm滤膜，即得。

2.1.3 HPLC-ELSD用庆大霉素对照品溶液制备 取庆大霉素对照品10 mg，精密称定，置10 ml量瓶中，加0.2 mol/L三氟醋酸-甲醇（92:8）溶解并稀释至刻度，摇匀，过0.45 μm滤膜，即得。

2.1.4 UPLC-MS/MS用庆大霉素对照品标准储备液 取庆大霉素对照品38.9 mg（相当于庆大霉素C110.0 mg），精密称定，置10 ml量瓶中，加水溶解并稀释至刻度，摇匀即得。配制完后转移至塑料离心管内于4 ℃冰箱保存，有效期为1个月。

2.1.5 UPLC-MS/MS用庆大霉素对照品工作溶液 取庆大霉素标准储备液1.0 ml，置10 ml量瓶中，加5 mmol/L七氟丁酸酐溶液稀释至刻度，摇匀；取100 µl，置10 ml量瓶中，加5 mmol/L七氟丁酸酐溶液稀释至刻度，摇匀，既得。配制完后转移至塑料离心管内于4 ℃冰箱保存。

2.1.6 5 mmol/L七氟丁酸酐溶液 取0.25 ml HFBA，加水稀释至200 ml，摇匀，即得。

2.2仪器条件

2.2.1 HPLC-ELSD色谱条件 色谱柱：资生堂 MG C18（4.6 mm×250 mm，5 μm），流动相：0.2mol/L三氟醋酸 -甲醇（92:8），流速：1.0 ml/min，柱温:25 ℃，进样量：10 μl ，蒸发光散射检测器（ELSD，漂移管温度110 ℃，载气流量2.8 L/min）。

2.2.2 UPLC色谱条件 色谱柱：Waters C18（2.1×50 mm，1.7 μm），流动相：0.1%甲酸乙腈溶液-0.1%甲酸水溶液（10∶90），流速：0.3 ml/min，柱温：30 ℃，进样量：10 μl。

2.2.3 质谱条件 电喷雾离子源（ESI+）；离子源温度为110 ℃；检测方式为多反应监测（MRM）；毛细管电压为3.2 KV；雾化气温度为350 ℃；雾化气流速为650 L/h；锥孔气流速为50 L/h；碰撞气体为氩气。庆大霉素C1的定性、定量离子对及对应的锥孔电压、碰撞能量参考值见表1。

表1庆大霉素C1定性、定量离子对及对应锥孔电压、碰撞能量参考值

Table 1.Mass spectrometry detection conditions of Gentamicin C1

| 药物名称 | 定性离子对  （m/z） | 定量离子对  （m/z） | 锥孔电压  （V） | 碰撞能量  （eV） |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 庆大霉素C1 | 478.6 >157.1 | 478.6 >157.1 | 60 | 22 |
| 478.6>322.1 | 60 | 15 |

**3.结果与分析**

3.1非法添加物的发现及初步分析 某单位在兽药监督工作中发现一批鱼腥草注射液样品中疑似添加有庆大霉素，由于技术条件有限，委托我所予以确认。由于庆大霉素分子结构中无共轭双键，无紫外吸收，无法采用常规的HPLC-PDA方法进行初筛，故笔者参考《中国兽药典》一部硫酸庆大霉素检查项下庆大霉素C组份的HPLC-ELSD测定方法进行初筛，色谱条件参见2.2.1，溶液的配制参见2.1.1和2.1.3，发现这批鱼腥草注射液样品在与庆大霉素对照品四个组份相应位置出现相同色谱峰，且四个组份的含量比例接近，进一步确定，此样品中添加有庆大霉素（图1-2）。

在以上结果的基础上，建立针对此批样品的UPLC-MS/MS的庆大霉素检查方法，并对实际样品进行检测。

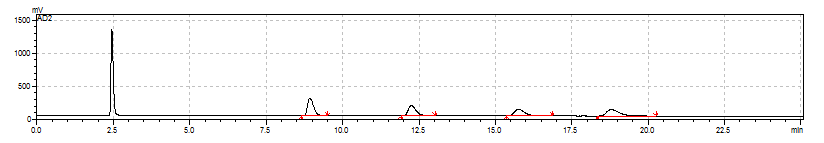


图1.庆大霉素对照品（1 mg/ml）色谱图（依次为庆大霉素C1a、C2、C2a、C1）

Fig.1 Chromatogram of Gentamicin（1 mg/ml）(Gentamicin C1a、C2、C2a、C1）

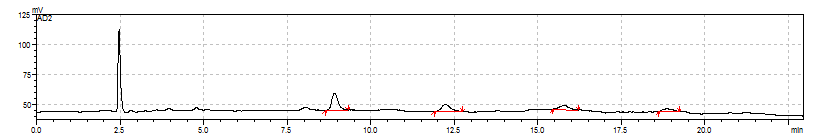


图2.鱼腥草注射液色谱图（依次为庆大霉素C1a、C2、C2a、C1）

Fig.2 Chromatogram of Houttuynia Injection (Gentamicin C1a、C2、C2a、C1）

3.2 UPLC-MS/MS方法学考察

3.2.1 专属性 通过溶剂空白试验和鱼腥草注射液空白试验排除溶剂及制剂处方中主要成分对于被测物的干扰。精密量取5 mmol/L七氟丁酸酐溶液、鱼腥草注射液空白溶液、庆大霉素对照品溶液（相当于庆大霉素C11 ug/ml）10µl，照2.2.2和2.2.3液相质谱条件，注入UPLC-MS/MS，记录特征离子质量色谱图，结果表明5 mmol/L七氟丁酸酐、鱼腥草注射液本底对庆大霉素C1检测无干扰（图3-5）。



图3. 5 mmol/L七氟丁酸酐溶液特征离子质量色谱图

Fig.3 Characteristic ions mass spectrometry of HFBA (5 mmol/L)



图4. 鱼腥草注射液空白溶液特征离子质量色谱图

Fig.4 Characteristic ions mass spectrometry of sample blank



图5. 庆大霉素C1对照品溶液特征离子质量色谱图

Fig.5 Characteristic ions mass spectrometry of Gentamicin C1

3.2.2 线性 取庆大霉素对照品储备液（相当于庆大霉素C11.0 mg/ml）150 µl置10 ml容量瓶中，加5 mmol/L七氟丁酸酐溶液稀释至刻度，摇匀，得浓度为15 µg/ml的庆大霉素C1对照品溶液；精密量取上述溶液1 ml、3 ml、5 ml、7 ml、9 ml置100 ml量瓶中，加5 mmol/L七氟丁酸酐溶液稀释至刻度，摇匀，得浓度为0.15 µg/ml、0.45 µg/ml、0.75 µg/ml、1.05 µg/ml、1.35 µg/ml的标准曲线溶液，照2.2.2和2.2.3液相质谱条件测定。按庆大霉素C1定量离子峰面积与对应的浓度作标准曲线，并计算回归方程和相关系数。庆大霉素C1回归方程为y=5519.3x+879.24，R=0.9965。表明庆大霉素C1在0.15 µg/ml～1.35 µg/ml 浓度范围内，峰面积与浓度呈良好的线性关系。

3.2.3 检测限 添加适量庆大霉素对照品储备液至1.0 ml鱼腥草注射液空白样品中，按2.1.2同法处理，照2.2.2和2.2.3液相质谱条件测定，观察庆大霉素C1特征离子质量色谱峰信噪比（S/N）和对应药物浓度，S/N＞3作为方法的检出限。取鱼腥草注射液空白样品1.0 ml三份，置刻度管中，分别加入庆大霉素对照品储备液（相当于庆大霉素C11.0 mg/ml）适量（100 µl、150 µl、200 µl），加5 mmol/L七氟丁酸酐溶液稀释至10 ml，摇匀；取200 μl，置刻度管中，加5 mmol/L七氟丁酸酐溶液稀释至10 ml，摇匀；过0.22 μm滤膜，精密吸取上述检测限样品溶液各10 µl，注入液相色谱仪，照2.2.2和2.2.3液相质谱条件测定检测限，结果表明中间加入量为庆大霉素C1的检测限，为0.15 g/L。

3.2.4 准确度及精密度 以鱼腥草注射液空白样品加庆大霉素对照品做回收率试验来考察方法的准确度。回收率试验溶液配制：取鱼腥草注射液空白样品1.0 ml、庆大霉素对照品储备液（相当于庆大霉素C11.0 mg/ml）750 µl，置同一10 ml量瓶中，加5 mmol/L七氟丁酸酐溶液稀释至刻度，摇匀；取200 μl，置10 ml量瓶中，加5 mmol/L七氟丁酸酐溶液稀释至刻度，摇匀；过0.22 μm滤膜，平行配制上述试验溶液各6份。精密吸取上述试验溶液各10 µl，注入液相色谱仪，照2.2.2和2.2.3液相质谱条件检测。结果显示：鱼腥草注射液中庆大霉素C1回收率为97.7%，RSD为5.5%。

3.3 样品测定结果 参考欧盟2002/657/EC中有关规定，样品溶液色谱图中如出现与对照品保留时间一致的峰（差异小于等于±2.5%），定性离子对与对照品一致（参见表1），特征离子丰度比与对照品溶液的一致（偏差符合表2的要求），计算样品中庆大霉素C1的浓度，如大于检测限，判定为检出庆大霉素。取鱼腥草注射液待测样品照2.1.2制备方法操作，照2.2.2和2.2.3液相质谱条件测定庆大霉素，结果为：鱼腥草注射液中庆大霉素C1含量为0.86 g/L，阳性样品检测结果见表3

表2 离子丰度比的最大允许偏差

Table 2. Maximum permitted tolerances for relative ion intensities

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 相对丰度(%) | >50 | >20~50 | >10~20 | ≤10 |
| 允许的最大偏差(%) | ±20 | ±25 | ±30 | ±50 |

表3 阳性样品检测结果

Table 3. Result of the sample

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 名称 | 保留时间（min） | 分子离子 | 碎片离子1 | 碎片离子2 | 特征离子  丰度比（%） |
| 庆大霉素C1对照品 | 1.41 | 478.6 | 157.1 | 322.1 | 73 |
| 鱼腥草注射液阳性样品 | 1.43 | 478.6 | 157.1 | 322.1 | 68 |

**4.讨论**

4.1筛查思路的选择 目前非法添加物筛查工作总体上可分为无目标筛查和有目标筛查两种。无目标筛查主要是针对新发现的非法添加物，借助色谱光谱质谱核磁等[6]分析手段，结合合理的临床药理依据，推导出可能的化合物结构及名称；有目标筛查是指在各实验室已积累的非法添加物数据库基础上，对样品进行数据库中收载的化合物筛查，常见的方法有液相色谱—二极管阵列法（HPLC-PDA）[7]、液相色谱—高分辨质谱法、液相色谱—串联质谱法等(HPLC-MS/MS) [8]。本研究属于有目标筛查范围，由于庆大霉素结构中不含有共轭双键，无紫外吸收，无法采用HPLC-PDA法进行筛查，同时由于庆大霉素为多组分化合物，同时建立包含各组分的质谱分析方法工作量大且无必要，故笔者先采用HPLC-ELSD法对样品进行初筛，首先明确样品是否添加有庆大霉素，再选取庆大霉素主要成分之一庆大霉素C1，建立相应的HPLC-MS/MS检测方法。

4.2 UPLC-MS/MS测定溶剂、流动相的选择 由于庆大霉素在水中易溶，在乙醇、丙酮或乙醚中不溶[9]，故选择水作为对照品溶剂。在无离子对情况下，庆大霉素在C18硅胶柱上无保留，在流动相中添加20mmol/L七氟丁酸酐溶液后，情况改善，保留时间为6.1min，但这类抑制剂会抑制离子化，污染LC/MS表面，减低仪器灵敏度，故本研究尝试以5 mmol/L七氟丁酸酐溶液代替水作为对照品储备液和样品的稀释溶剂，发现即可改善庆大霉素无保留情况又可降低对仪器的损害。

4.3 溶液储存条件的选择 氨基糖苷类抗生素对极性表面有非常高的吸附亲和力，所以容量瓶、样品瓶等试验用具应尽量选择吸附性弱的材质，玻璃和其他吸附性强的塑料制品均会对庆大霉素产生强烈的吸附作用，导致样品的损失，在溶液储存时应当尽量避免[10-13]。庆大霉素在酸性水溶液和碱性水溶液中均稳定，其水溶液在4~8℃可以保存六个月[11]。

**5.小结**

本文建立了一种系统筛查鱼腥草注射液中非法添加庆大霉素的筛查方法，结合了液相色谱操作简单普及率高和液相色谱串联质谱准确灵敏的优势，进一步完善了非法添加检测工作中有目标筛查版块的技术储备。该方法具有良好的可操作性和重现性，可广泛应用于非法添加检测工作。

**参考文献：**

[1] 中国兽药典委员会．兽药国家标准化学药品、中药卷[S]. 北京：化学工业出版社，2013：256.

The Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia, National Standards of Veterinary Drug (the volume of chemical drug

and traditional Chinese medicine) [S]. Beijing: Chemical Industry Press, 2013：256.

[2] 中华人民共和国农业部公告第2448号. 鱼腥草注射液中非法添加甲氧氯普胺检查方法[S]. 2016.

Announcement No. 2448 of the Ministry of Agriculture. Determination of Metoclopramide in Houttuynia Injection[S]. 2016.

[3] 中华人民共和国农业部公告第2448号. 鱼腥草注射液中非法添加林可霉素检查方法[S]. 2016.

Announcement No. 2448 of the Ministry of Agriculture. Determination of Lincomycin in Houttuynia Injection[S]. 2016.

[4] 中华人民共和国农业部公告第2448号. 鱼腥草注射液中非法添加水杨酸、氧氟沙星检查方法[S]. 2016.

Announcement No. 2448 of the Ministry of Agriculture. Determination of Salicylic Acid and Ofloxacin in Houttuynia Injection[S]. 2016.

[5] 中国兽药典委员会．兽药使用指南化学药品卷[S]. 北京：中国农业出版社，2010：32.

The Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. The Usage Guideline of Veterinary Drug( the volume of chemical drug)[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2010：32.

[6] 董玲玲，曹 莹，于晓辉，等．HPLC—PDA联合UPLC—Q/TOF法确证硫酸卡那霉素注射液中的非法添加物[J]. 中国兽药杂志，2016,50（8）：15-19.

Dong L L, Cao Y, Yu X H, *et al.* Identification of Compound Illegally Adulterated in One Batch of Kanamycin Sulfate Injection by UPLC-Q/TOF MS and HPLC-PDA Method[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2016, 50(8): 15-19.

[7] 王静文，龚旭昊，范 强，等．三种呼吸系统兽药制剂中非法添加盐酸溴己新、吲哚美辛的HPLC-PDA检测方法的建立[J]. 中国兽药杂志，2016,50（12）：45-50.

Wang J W, Gong X H, Fan Q, *et al.* Determination of Bromhexine Hydrochloride and Indometcain Illegally Added in Three Veterinary Preparations by HPLC-PDA[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2016, 50(12): 45-50.

[8] 中华人民共和国农业部公告第2448号.阿维拉霉素预混剂中非法添加莫能菌素检查方法[S]. 2016.

Announcement No. 2448 of the Ministry of Agriculture. Determination of Monensin in Avilamycin Premix[S]. 2016.

[9] 中国兽药典委员会．中华人民共和国兽药典2015年版一部[S]. 北京：中国农业出版社，2015：352.

  The Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. the Veterinary Pharmacopoeia of the People’s Republic of China[S].

Beijing: China Agriculture Press, 2015：352.

[10] Heller D N, Peggins J Q, Nochetto CB, *et al.* LC/MS/MS measurement of gentamicin in bovine plasma, urine, milk, and biopsy samples taken from kidneys of standing animals[J]. *J Chromatoger B Analyt Technol Biomed Life Sci,* 2005,821(1):22-30.

[11] Heller D N, Clark S B, Righter H F. Confirmation of gentamicin and neomycin in milk by weak cation-exchange extraction and electrospray ionization/ion trap tandem mass spectrometry[J]. *J Mass Spectrom,* 2000,35(1):39-49.

[12] A Boussairi, F Guyon. Liquid chromatographic analysis with electrochemical detection for Bromhexine Hydrochloride in human plasma[ J] .Chromatographic, 1987,23(9): 651- 652.

[13] Ishii R, Horie M, Chan W, *et al.* Multi-residue quantitation of aminoglycoside antibiotics in kindney and meat by liquid chromatography with tandem mass spectrometry[J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2008,25(12):1509-1519.

1. **项目基金：**兽药安全与质量评价技术研究与应用（2015BAD11B03-4）

   **作者简介：**王静文，硕士研究生，从事药品检验及相关工作。

   **通讯作者：**范 强。 E-mail:fanqiang@ivdc.org.cn [↑](#footnote-ref-1)